

インフルエンザウィルスの粒子形成機構

著者	榎並 正芳
著者別表示	Enami Masayoshi
雑誌名	平成8(1996)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1995-1996
ページ	5p.
発行年	1997-03
URL	http://doi.org/10.24517/00051040



インフルエンザウイルスの粒子形成機構

(課題番号：07670339)

平成7～8年度科学研究費補助金〔基盤研究(C)(2)〕

研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 榎 並 正 芳

(金沢大学医学部助教授)

は し が き

研究組織

研究代表者：榎並 正芳（金沢大学医学部助教授）

研究経費

平成7年度 1,000千円

平成8年度 1,200千円

計 2,200千円



8000-55149-7

金沢大学附属図書館

研 究 発 表

(1) 学会誌等

- 1) 榎並正芳、ネガティブ鎖RNAウイルスの遺伝子操作：最近の展開、ウイルス、1995。
- 2) Isolation of the measles virus hemagglutinin protein in a soluble form by protease digestion. T. A. Sato, M. Enami, and T. Kohama. *J. Virol.*, 69, 513-516, 1995.
- 3) M. Enami and K. Enami. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J. Virol.* 70, 6653-6657, 1996.

(2) 口頭発表

- 1) M. Enami. Mechanism of influenza virus assembly. 1995年5月、Marrakech。
- 2) 榎並正芳、榎並和枝、中島捷久、インフルエンザウイルスの粒子形成における膜蛋白質HA、NAの役割、第43回日本ウイルス学会、1995年10月、岡山。
- 3) 榎並正芳、榎並和枝、ヘルパーウイルスを必要としないインフルエンザウイルス・トランスフェクタントの作成系、第43回日本ウイルス学会、1995年10月、岡山。
- 4) 佐藤威、榎並和枝、森川茂、巽 正志、田代真人、榎並正芳、組換え体バキュロウイルスを用いた麻疹ウイルス分泌型H及びF糖蛋白質の発現、第43回日本ウイルス学会、1995年10月、岡山。
- 5) 榎並正芳、A. Galcia-Sastre、榎並和枝、P. Palese、インフルエンザウイルスの遺伝子操作、第18回日本分子生物学会年会、1995年12月、名古屋。
- 6) M. Enami. The role of the hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins in influenza A virus assembly. Options for the control of Influenza III, 1996年5月、Cairns。
- 7) 榎並正芳、榎並和枝、インフルエンザウイルスNS1蛋白質の核外輸送とM1蛋白質の遺伝子発現制御、第44回日本ウイルス学会、1996年10月、静岡。
- 8) M. Enami. Genetic Engineering of Influenza Virus. Frontiers of RNA Virus Research: The Oji International Seminar in Natural Sciences, 1997, 1997年5月、京都。

(3) 出版物

- 1) 麻疹ウイルス. 榎並正芳, 小浜友昭. 「ウイルス実験プロトコール」 (永井美之、石浜明 監、小林信之、永田恭介 編) pp198-203, メジカルビュー社, 1995.
- 2) M. Enami. The role of the hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins in influenza A virus assembly. in "Options for the control of Influenza III" ed. by L. E. Brown, A. W. Hampson, R. G. Webster, Elsevier, Amsterdam, 1996.

研 究 の 概 要

「目的」

一般に、インフルエンザウイルスを含むエンベロープウイルスの粒子形成は複雑でその分子機構は明らかにされていない。インフルエンザウイルスの遺伝子は8種類のマイナス鎖RNAから成り、NP蛋白が結合したRNP構造を形成し、感染細胞の核内で複製する。感染後期に至ると、このRNPは細胞質へ移行し、ウイルス構造蛋白質と共に細胞表面から出芽様過程を経てウイルス粒子に取り込まれる。本研究では、代表的エンベロープウイルスであるインフルエンザウイルスを取り上げ、その粒子形成機構を分子生物学的に解明する事を目的とした。得られた結果の多くはすでに論文として発表したもので、詳しくはそちらを参照いただく事とし、以下に、その概略のみを記した。

「材料と方法」

ウイルス膜蛋白質HA及びNAの細胞質ドメインとRNP及びこれに結合したM1蛋白質の相互作用を検証するため、ウイルス感染細胞を破碎後、核除去画分から細胞膜画分をショ糖密度勾配遠心で分画した。膜画分でのウイルス蛋白質の相互作用を免疫沈降法により解析した。次に、リバーシジェネティクスの手法を用いNA細胞質ドメインに種々の変異を持つウイルスを作成し、解析した。さらに、細胞内で、ウイルス蛋白質をT7ワクチニアウイルスを用いプラスミドDNAから発現し解析した。

一方、ウイルスRNPに結合する蛋白質を知るため、グリセロール密度勾配遠心によりRNPを単離、相互作用する蛋白質を解析した。

ウイルス粒子からグリセロール密度勾配遠心によりRNPを単離した。NSあるいはNPの遺伝子に対するcDNA断片を加えRNaseHで処理した。変異を導入したNSあるいはNPのcDNAから試験管内でRNPを再構成した。前者と後者のRNPを共に細胞に導入した。アガーを含む培地を重層し37℃で3日間培養し得られたプラークを単離解析した。

「結果」

ウイルス感染中期に合成されたM1蛋白質の多くはウイルス集合が起きる感染後期に細胞膜画分に集合した。次に、ウイルス膜蛋白質HA及びNAとM1蛋白質を個々に組換え体ワクチニアウイルスを用いて発現したところ、M1蛋白質単独では細胞膜との強い結合は見られなかった(20~40%)が、HA及びNA蛋白質、特にNA蛋白質がM1蛋白質の細胞膜への結合を強く促進した(>90%)。そこで、cDNA上でNA蛋白質細胞質領域に変異を導入し、変異NA蛋白質の機能を解析した。変異の導入はM1蛋白質の膜結合促進活性を失わせた。RNPトランスフェクション法により作成した変異NA蛋白質を持つ組換え体インフルエンザウイルスはウイルス集合が不完全なウイルスである事が確認された。しかし一方で変異ウイルスの欠損の程度は弱く正常なHA蛋白質単独である程度のウイルス集合が可能なことも確認された。

次に、ウイルスRNPの核外輸送におけるウイルスNS1蛋白質の役割と機能構造の解析を行った。ウイルス感染細胞内ではNS1蛋白質は核内でRNPに結合し細胞質内では遊離

の状態が存在していた。NS1蛋白質はウイルス蛋白質中感染細胞内で最も強くリン酸化を受ける蛋白質である。種々のリン酸化酵素阻害剤6種類による、NS1蛋白質リン酸化の阻害を解析したところ、cGMP依存性蛋白質リン酸化酵素阻害剤H8による特異的阻害が確認された。またリン酸化阻害による、NS1蛋白質のRNPへの結合も阻害された。

種々の部位特異的変異を持つウイルスを作成し解析する事は有力な手段である。これまでは限られた遺伝子にのみ変異の導入が可能であった。ウイルス粒子から単離したRNPを任意の遺伝子に対するcDNAとRNaseHで処理し、cDNAから試験管内で再構成したRNPと共に細胞に導入することにより様々な変異ウイルスを作成する技術を開発した。NS1蛋白質への変異導入により、これまで報告されていたNLS2（核移行シグナル2）及びeffector ドメインを含むC端側の50%を削除してもウイルスは増殖し、必須ではない事が明らかとなった。

「考察」

最近、R. Lambらは、HAとNAの細胞質領域を同時に欠く二重変異体を作成した。本ウイルスは、ウイルス産生は非常に抑制され、また、電子顕微鏡観察によると、通常のウイルス粒子構造（球状構造）とは事なり、非常に長いひも状の構造を取ることが確認された（未発表）。すなわち、ウイルス粒子形成に於て、HAあるいはNAは類似の機能を持ち、どちらかが有れば良いが、両方を欠くと粒子形成に損傷が起こるのであろう。

本研究成果により、インフルエンザウイルスの任意の遺伝子に自由に変異を導入する事が可能となった。今後はウイルス蛋白質の機能構造を変異ウイルス感染細胞内で解析して行きたい。